

9/700993

PCT/JP 99/02644

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

20.05.99

EAKU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 5月22日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第141717号

出 願 人
Applicant (s):

麒麟麦酒株式会社

REC'D 09 JUL 1999

WIPO PCT

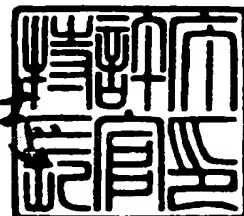
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月17日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山 佐 平 建



出証番号 出証特平11-3041136

【書類名】 特許願

【整理番号】 P98-0228

【提出日】 平成10年 5月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 エンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内

【氏名】 小林 和男

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内

【氏名】 竹内 誠

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内

【氏名】 岩松 明彦

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市仰木の里東 6丁目 9-3

【氏名】 山本 憲二

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市日吉台 3丁目 32-2

【氏名】 熊谷 英彦

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内

【氏名】 吉田 聡

【特許出願人】

【識別番号】 000253503

【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9406585

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。

(a) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質

【請求項 2】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子。

(a) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質

【請求項 3】 以下の(c)又は(d)のDNAを含む遺伝子。

(c) 配列番号 2 に示される塩基配列からなるDNA

(d) 配列番号 2 に示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項 4】 請求項 2 記載の遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子。

【請求項 5】 遺伝子が、ムコール属に属する微生物由来のものである請求項 2～4 のいずれか1項に記載の遺伝子。

【請求項 6】 ムコール属に属する微生物がムコール・ヒエマリスである請求項 5 記載の遺伝子。

【請求項 7】 請求項 2～6 のいずれか1項に記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項 8】 請求項 7 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項 9】 請求項 8 記載の形質転換体を培養し、得られる培養物からエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを採取することを特徴とするエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子に関するものである。詳しくは該遺伝子が *Mucor* 属由来の遺伝子に関するものである。更に本発明は、該遺伝子を含む組換えプラスミド、該プラスミドにより形質転換された生物、該形質転換体を用いた新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

糖タンパク質は動植物の組織、真核微生物の細胞膜、壁などに広く存在している。

近年、糖タンパク質の糖鎖が、細胞の分化、癌化、細胞間の認識などの機構に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあり、その機構解明のため糖鎖の構造と機能との相関について研究が進められている。その目的達成のための手段として、糖タンパク質から糖鎖を切り出す際、あるいは糖鎖の構造の同定の際に様々なグリコシダーゼが用いられている。その中でも、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、糖タンパク質に存在するアスパラギン結合型糖鎖（N-結合型糖鎖、N型糖鎖）に作用して、糖鎖中に存在するジアセチルキトビオース部分を切断し糖鎖を遊離する作用を有する。

【0003】

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、糖タンパク質の糖鎖部分をタンパク質部分より遊離することができるため、糖タンパク質糖鎖の構造、機能の解析に重要であると考えられる。

アスパラギン結合型糖鎖は、その構造から高マンノース型（マンナン型糖鎖）

、ハイブリッド型及びコンプレックス型に分類される。

【0004】

従来知られているエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼとしては、Endo H (A. L. Tarentino and F. Maley, 1 J. Biol. Chem. 0, 249, 811 (1974))、Endo F (K. Takegawa, et al., 1 Eur. j. Biochem. 0, 202, 175 (1991))、Endo A (K. Takegawa, et al., 1 Appl. Environ. Microbiol. 0, 55, 3107 (1989))等が挙げられるが、これらの酵素は特定の構造の糖鎖に対してのみ作用し、また糖タンパク質に対しては変性剤の存在下でなければ作用しない。

【0005】

ムコール・ヒエマリス (*Mucor hiemalis*) 由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、高マンノース型 (マンナン型糖鎖)、ハイブリッド型のみならず、コンプレックス型についても三分岐複合糖鎖まで切断能があり、また脱シアル型であれば四分岐複合糖鎖まで切断能があり、さらに、タンパク質を変性処理することなく、糖タンパク質から糖鎖を遊離することができることが知られている (S. Kadowaki, et al., 1 Agric. Biol. Chem. 0, 54, 97 (1990))。従って、ムコール・ヒエマリス由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、糖タンパク質の糖鎖及びタンパク質の機能的、生理的役割を研究する上で有用であるといえる。

【0006】

一方、酵母由来のマンナン型糖鎖からヒト適応型糖鎖に変換することは物質生産の面では非常に意義があることである。その変換方法としては、酵母の糖鎖合成系を遺伝子操作により改変するという *in vivo* での変換とともに、トランスグリコシレーション反応を利用した *in vitro* での変換が考えられる。糖変換を目的とするエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの特性として、1) 基質特異性としてマンナン型、複合型の両方に対して切断能力を持つこと、2) 分解反応の逆反応であるトランスグリコシレーション反応を行う能力を持つことが要求される。従って、*Mucor hiemalis* 由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは上記変換を行うためにふさわしい酵素であるといえる。

【0007】

なお、本発明者らは、酵母型糖鎖をヒト適応型に変えることができる *Mucor hiemalis* 由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを用いた糖鎖変換技術を提案している（特開平7-59587号公報）。

【0008】

以上の様な糖鎖変換を行うためには大量かつ精製度の高い酵素標品が必要となる。この場合、カビの菌体を用いた従来の育種法により酵素生産性の向上を目指すことも考えられる。しかし、従来の育種方法は、主として、紫外線や変異誘発剤によって得られる変異株から選択する方法に限られていたため、安定な変異体を単離するのが困難であった。また、従来法による育種の場合、好まざる形質変化を伴うことも多い。更に、一般的にカビは様々なタンパク質分解酵素を生成するため、糖変換を目的とした酵素を生産するには好ましいものではない。従って、これらの問題点を除去するには多段の精製ステップを踏まねばならないため、作業が繁雑となり、かつ酵素の収量も少ない。例えば、毛カビの一種である *Mucor* 属に属する微生物を培養し、その培養上清より酵素の精製を行っても、プロテアーゼの混入を除くことができず、かつ菌体の酵素生産性が低いため大量調製することが困難であり、実用上の価値は少なかった。

【0009】

以上のことから、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを大量生産するためには、該酵素の遺伝子を取得し、遺伝子工学的にそれを生産することが望まれている。さらに、遺伝子を取得出来れば、蛋白工学の技術を用いて、耐熱性、耐pH性の向上、反応速度が増大された酵素を得ることも期待できる。しかしながら遺伝子クローニングを試みられているが現在までにその報告はない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及びエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの製造方法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、公知エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの部分アミノ酸配列情報をもとに、当該酵素の生産菌であるムコール・ヒエマリス (*Mucor hiemalis*) から調製したcDNAライブラリーより当該酵素をコードする遺伝子を取得することに成功し、さらに酵母での発現にも成功し、本発明を完成するに至った。

【0012】

すなわち、本発明は、以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質である。

(a) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号3に示されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質

【0013】

さらに、本発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子、及び該遺伝子とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子である。

(a) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号3に示されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質

【0014】

さらに、本発明は、以下の(c)又は(d)のDNAを含む遺伝子である。

(c) 配列番号2に示される塩基配列からなるDNA

(d) 配列番号2に示される塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

上記遺伝子としては、ムコール属に属する微生物（例えばムコール・ヒエマリ

ス) 由来のものが挙げられる。

【0015】

さらに、本発明は、前記遺伝子を含有する組換えベクターである。

さらに、本発明は、前記組換えベクターを含む形質転換体である。

さらに、本発明は、前記形質転換体を培養し、得られる培養物からエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを採取することを特徴とするエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの製造方法である。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明は、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを生産する菌を培養し、得られる培養物からエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを精製した後、該酵素の部分アミノ酸配列から縮重プローブを設計し、PCRを行うことにより該酵素をコードする遺伝子をクローニングし、さらにエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを生産する菌のcDNAライブラリーより該酵素をコードする遺伝子をクローニングすることを特徴とする。また、本発明は、クローニングされた遺伝子をベクターに組込んで組換えベクターを得るとともに、該組換えベクターを宿主細胞に導入して形質転換体を得ることを特徴とする。さらに、本発明は、前記形質転換体を培養することにより、大量にエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを生産することを特徴とする。

【0017】

1. エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを生産する菌の培養

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを生産する菌としては、ムコール属(Mucor属)に属する菌体、好ましくはムコール・ヒエマリス(Mucor hiemalis)、より好ましくは工業技術院生命工学技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託されているMucor hiemalis(受託番号FERM BP-4991)が挙げられる。

【0018】

これらの菌株の培養に用いる培地組成は通常の微生物の培養に用いられるものであればどのようなものでもよい。

炭素源としては、例えばグルコース、シュクロース、マンノース、ガラクトース、マルトース、可溶性デンプン、デキストリン等の糖質、窒素源としては酵母エキス、トリプトン等が挙げられる。無機塩としては上記の窒素源に含有する無機塩の他に、各種ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、リン酸塩等の塩類が用いられ、場合によってはビタミン類などを添加してもよい。

【0019】

培養は培地を通常の方法で滅菌し、菌株を接種後、20～30℃、pH5～7で2～4日間振とう又は通気攪拌培養を行う。

本発明においては、温度が25～30℃、pHが6、炭素源としてガラクトース、窒素源として酵母エキス、トリプトンを用い、炭素源、窒素源の濃度がともに2～3%、炭素源と窒素源との比が2：3で3～4日間、良好な通気条件で培養することがより好ましい。このような培養条件で培養した場合は、酵素の生産量が最大となり、公知の方法 [S. Kadowaki, et al., Agric. Biol. Chem., 54, 97 (1990) ; グルコース0.5%、酵母エキス1%、ペプトン1%] と比較して約10倍の酵素生産性を得ることができる。

なお、本発明においては、微生物を培養する際に通気条件を確保するため、ジャーファーマンターを用いることが好ましい。

【0020】

2. エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの精製

上記菌株が生産するエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼは、以下の活性の保持を特徴とするものである。すなわち、糖タンパク質に存在するアスパラギン結合型糖鎖に作用して、糖鎖中に存在するジアセチルキトビオース部分を切断し、糖鎖を遊離する活性で特徴付けられる。

【0021】

エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの精製は、公知の分離、精製方法を適当に組み合わせて行なうことができる。例えば塩沈殿、溶媒沈殿のような溶解性の差を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過およびSDS-ポリアクリル電気泳動のような分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーの

ような電荷の差を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーのような疎水性の差を利用する方法、さらに等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

【0022】

本発明においては、前述の通り公知の方法(S. Kadowaki, et al., 1 Agric. Biol. Chem. 0, 54, 97 (1990))を改良した培養法を採用し、かつ多段の精製ステップを経ることによりエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを効率よく精製することができ、遺伝子を取得するために必要なアミノ酸配列を得る十分量のタンパク質を得ることができる。得られる酵素は、酵素精製の結果、及び後述の遺伝子解析の結果、分子量約85,000で単一の遺伝子産物によって構成され、遺伝子の翻訳後の限定分解を経て少なくとも分子量約60,000及び14,000のペプチドを含む2つ以上のサブユニットから構成されることを見出した。

【0023】

3. 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子のクローニング

*Mucor hiemalis*より得られるエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは少なくとも2つ以上のペプチドより構成されていることがわかった。

一般に、ある特定のタンパク質をコードする遺伝子を単離する場合、タンパク質の部分アミノ酸配列を決定し、その縮重コドンからなる混合オリゴヌクレオチドをプローブとして、遺伝子ライブラリーから目的の遺伝子を単離することが可能である。また、本発明において実施したようなPCRによる部分断片の取得後、その断片をプローブとして遺伝子ライブラリーから目的の遺伝子を単離することも可能である。

【0024】

しかしながら、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、2種類以上のサブユニットからなるヘテロオリゴマー分子であるため、それぞれのサブユニットがそれぞれ異なる遺伝子に独立してコードされる可能性がある。また、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼがひとつの遺伝子から由来するにしても2つのサブユニットをコードする領域が構造遺伝子のなかでどのような位置関係となっているかなど、その構造については明らかではない。

【0025】

そこで、発明者らは2つのサブユニットの部分アミノ酸配列を決定し、さらにPCRによる部分断片の取得の後、該断片をプローブとしたcDNAのクローニングに成功し、遺伝子構造を解析することによって、これら2つのサブユニットが同一の遺伝子にコードされることを明らかにした。すなわち、新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼは、該酵素をコードする遺伝子から1つのポリペプチドとして生成され、部分分解を受けることにより2つ以上のサブユニットへとプロセスされていることが明らかにされた。

【0026】

本発明の遺伝子は、例えば以下のようにしてクローニングされる。

(1) エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子のクローニング

本発明において、新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼをコードしている遺伝子を含むDNA断片の具体例としては、図2に示される制限酵素地図で表されるDNA断片が挙げられる。この断片は、*Mucor*属に属する菌体、好ましくは*Mucor hiemalis*株、より好ましくは工業技術院生命工学技術研究所に受託番号FERM BP-4991の番号のもとに寄託されている*Mucor hiemalis*株より調製されるmRNAを鋳型としたcDNAライブラリーから遺伝子工学的な手法を用いて単離することができる(Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, Maniatisら、Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989))などに記載の方法を参照)。

【0027】

mRNAの調製は、通常の手法により行うことができる。例えば、mRNAの供給源である*Mucor hiemalis*を培養した後、市販のキット(ISOGEN(ニッポンジーン社))で処理して全RNAを得、市販の精製キット(mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech))を用いて精製することができる。なお、mRNAの調製にはmRNAの分解を抑制する意味で培養時間を短くすることが好ましい。

【0028】

このようにして得られたmRNAを鋳型として、オリゴdTプライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを合成した後、該一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する。

得られた二本鎖cDNAを適当なクローニングベクターに組み込んで組換えベクターを作製する。得られる組換えベクターを用いて大腸菌等を形質転換し、テトラサイクリン耐性、アンピシリン耐性を指標として形質転換体を選択することにより、cDNAのライブラリーを得ることができる。

【0029】

ここで、大腸菌の形質転換は、Hanahanの方法 [Hanahan, D.: J. Mol. Biol. 166: 557-580 (1983)] などに従って行うことができる。なお、ベクターとしてプラスミドを用いる場合はテトラサイクリン、アンピシリン等の薬剤耐性遺伝子を含むことが必要である。また、プラスミド以外のクローニングベクター、例えばλファージ等を用いることもできる。

【0030】

上記のようにして得られる形質転換体から目的のDNAを有する株を選択(スクリーニング)する。スクリーニング方法としては、例えば、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼのアミノ酸配列に対応するセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを合成し、これを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行う方法が挙げられる。例えば、鋳型DNAとしては、ゲノムDNA、又は前記mRNAから逆転写反応により合成されたcDNAが挙げられ、プライマーとしては、例えばセンス鎖についてはアミノ酸配列: PSLQLQPDDK (配列番号4) に基づいて合成した5'-CARTTCARCCNGAYGAYAA-3' (配列番号5) 及びアミノ酸配列: SYRNPEIYPTDQNIK (配列番号6) に基づいて合成した5'-CCHACNGAYCARAAYATYAA-3' (配列番号7) を用いることができる。また、アンチセンス鎖についてはアミノ酸配列:

SYRNPEIYPTDQNIK (配列番号6) に基づいて合成した3'-GGDTGNCTRG TYTTRTARTT-5' (配列番号8) 及びアミノ酸配列: GQRFNHRESHDVETEI (配列番号9) に基づいて合成した3'-TTYCCDGTYGCDAAARTTRGT -5' (配列番号10) を用いることができる。但し、本発明においてはこれらのプライマーに限定されるものではない。

このようにして得られたDNA増幅断片を、³²P、³⁵S又はビオチン等で標識してプローブとし、これを形質転換体のcDNAライブラリーを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を検索することによりスクリーニングすることができる。

【0031】

(2) 塩基配列の決定

得られたクローンについて塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキシム-ギルバートの化学修飾法、又はジデオキシ法等の公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定機（例えばPERKIN-ELMER社製377A DNAシーケンサー等）を用いて配列決定が行われる。

【0032】

配列番号1にエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全配列を示す。このうち、本発明の遺伝子の好ましい具体例としては、配列番号1に示される塩基配列の71番目から2305番目までの塩基配列（配列番号2）が挙げられる。また、本発明の遺伝子は、配列番号3に示されるアミノ酸配列又は後述する等価配列を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列をもつもののほか、縮重コドンにおいてのみ異なる同一のポリペプチドをコードする縮重異性体をも包含するものである。

【0033】

なお、等価配列を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列は、部位特異的突然変異誘発法などを利用して調製することができる。すなわち、Kunkel法若しくは Gapped duplex法等の公知手法又はこれに準ずる方法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutant-K(TAKARA社製)、Mutant-G(TAKARA社製)などを用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて変異が導入される。

【0034】

また、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子には、配列番号1又は2に示される塩基配列からなるDNAのほか、該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAも含まれる。ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が50～300mM、好ましくは150mMであり、温度が50～68℃、好ましくは65℃での条件をいう。

【0035】

一旦エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の塩基配列（配列番号1）が確定すると、該塩基配列の71番から2305番までの配列を有するDNA断片（オープンリーディングフレーム）の塩基配列が定まっていることから（配列番号2）、その後は化学合成によって、又は当該オープンリーディングフレーム（配列番号2）の5'および3'末端の塩基配列（例えば5'-ATGCCTTCACTTCAATTGCA ACC-3'（配列番号11）及び5'-CTAGTTTAATGACAAATCTATGC-3'（配列番号12））をプライマーとし、ゲノムDNAを鋳型としたPCRによって、あるいはエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子を得ることができる。

【0036】

なお、本発明の遺伝子を含むプラスミドpZL-Endo（後述する実施例3参照）は、大腸菌*E. coli* DH10Bに導入され（名称：DH10BpZL-Endo）、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成10年4月28日付でFERM BP-6335として寄託されている。

【0037】

本発明において、組換え新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの好ましい具体例としては、配列番号3に示されるアミノ酸配列、またはその等価配列を含んでなるポリペプチドが挙げられる。ここで、「等価配列」とは、配列番号3に示されるアミノ酸配列において、少なくとも1個のアミノ酸の挿入、置換若しくは欠失又は両末端への付加がなされたものであって、且つ上記した新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を依然として保持する配列をいう。その等価配列における新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性の保持とは、その活性を利用した実際の使用態様において、配列番号3に示される配列を全て有するポリペプチドと同一の条件でほぼ同様の利用が可能な程度の活性が維持されていることをいうものとする。このような等価配列は、配列番号3に示されている配列を参照すれば、当業者であれば格別の困難なしに選択し、製造可能であることは明らかである。例えば、配列番号3に示されるアミノ酸配列の少な

くとも1個、好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号3に示されるアミノ酸配列に少なくとも1個、好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が付加又は挿入してもよく、あるいは、配列番号3に示されるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。従って、配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列において2番から744番までに示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド(配列番号3に示されるアミノ酸配列の第1番目のメチオニンが欠失したもの)も本発明のタンパク質に含まれる。

【0038】

ここで、本発明による部分アミノ酸配列分析、および遺伝子構造解析によって前駆体ポリペプチドが少なくとも配列番号3に示されるアミノ酸配列の510番目のヒスチジン、及び627番目アスパラギン酸のアミノ酸のC末端側で切断されることにより、天然体の2つ以上のサブユニットが生じたものであることが明らかにされた。

【0039】

2. 組換えベクター及び形質転換体の作製

本発明においては、本発明の遺伝子を含んだDNA分子、特に発現ベクターが提供される。このDNA分子は、ベクター分子に本発明による新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼをコードするDNA断片を組み込むことによって得ることができる。従って、本発明の新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼをコードする遺伝子断片を、宿主細胞内で複製可能でかつ同遺伝子が発現可能な状態で含むDNA分子、特に発現ベクターの形態として宿主細胞の形質転換を行なえば、宿主細胞において本発明の新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを産生させることができる。

この発明によるDNA分子の作成は前掲のMolecular Cloning: A Laboratory Manualに記載の方法に準じて行なうことができる。

【0040】

(1) 組換えベクターの作製

本発明において利用されるベクターは、使用する宿主細胞の種類を勘案しながら、ウイルス、プラスミド、コスミドベクターなどから適宜選択できる。

例えば、宿主細胞が大腸菌の場合はλファージ系のバクテリオファージ、pBR系(pBR322, pBR325等)、pUC系(pUC118, pUC119等)のプラスミド、枯草菌の場合はpUB系のプラスミド(pUB110等)、酵母の場合はYEp、YCp系のベクター(例えばYEp13, YEp24, YCp50等)、あるいは後記する実施例で使用されるpG-3-Notが挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

【0041】

ベクターに本発明の遺伝子を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

本発明の遺伝子は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明のベクターには、形質転換体の選択マーカーを含むのが好ましく、選択マーカーとしては薬剤耐性マーカー、栄養要求マーカー遺伝子を使用することができる。

さらに、本発明の発現ベクターとしてのDNA分子は、新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の発現に必要なDNA配列、例えばプロモーター、転写開始信号、リボソーム結合部位、翻訳停止シグナル、転写終結シグナルなどの転写調節信号、翻訳調節信号などを有しているものが好ましい。

【0042】

(2)形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、エッシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)等のバチルス属、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)等のシュードモナス属に属する細菌が挙げられ、サッカロミ

セス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、キャンディダ・ボイジニイ (*Candida boidinii*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 等の酵母が挙げられる。

【0043】

宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母以外に、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞が挙げられ、あるいは Sf9、Sf21 等の昆虫細胞が挙げられる。

大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明の遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

大腸菌としては、例えばエッシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12、DH1、DH5 α 、JM109 などが挙げられ、枯草菌としては、例えばバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) MI 114、207-21 などが挙げられる。枯草菌にはタンパク質を菌体外へ分泌する株が存在することが知られている。またプロテアーゼを殆ど分泌しない株も知られており、このような株を宿主として用いることも好ましい。

【0044】

プロモーターとしては、挿入断片に含まれる宿主中でも機能することができる。プロモーターはもちろんのこと、大腸菌においてはラクトースオペロン (*lac*)、トリプトファンオペロン (*trp*) 等のプロモーターが挙げられる。

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌に DNA を導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法 [Cohen, S.N. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69: 2110-2114 (1972)]、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

【0045】

酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、カンジダ・ウティリス (*Candida utilis*) などが用いられる。この場合、プロモーターとしては酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えばアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)、酸性フォスファターゼ (PHO)、ガラクトース遺伝子

(GAL)、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素遺伝子(GAPDH)等のプロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、AOX1プロモーター等を好ましく用いることができる。

【0046】

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法[Becker, D.M. et al.: Methods. Enzymol., 194: 182-187 (1990)]、スフェロプラスト法[Hinnen, A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75: 1929-1933 (1978)]、酢酸リチウム法[Itoh, H.: J. Bacteriol., 153: 163-168 (1983)]等が挙げられる。

動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。プロモーターとしてSR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター等が用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。

【0047】

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9細胞、Sf21細胞などが用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが用いられる。

【0048】

4. 本発明のタンパク質の生産

本発明のタンパク質は、本発明の遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を有するもの、または該アミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸に前記変異が導入されたアミノ酸配列を有し、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するものである。

本発明のタンパク質は、前記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養上清、あるいは培養細胞若し

くは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。

本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【0049】

大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

【0050】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等が用いられる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、37℃で12～72時間行う。培養期間中、pHは4～7.5に保持する。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。

培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0051】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプ

ロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

【0052】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で2～10日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

培養後、本発明のタンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎することにより本発明のタンパク質を抽出する。また、本発明のタンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。

【0053】

組換え新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの精製は、公知の分離、精製方法を適当に組み合わせて行なうことができる。例えば塩沈殿、溶媒沈殿のような溶解性の差を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過およびSDS-ポリアクリル電気泳動のような分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーのような電荷の差を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーのような疎水性の差を利用する方法、さらに等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

【0054】

本発明においては、後記する実施例に示すように、サッカロミセス・セレビスエを宿主としてGAPDHプロモーターの支配下にこの遺伝子を発現させたところ、細胞抽出液中に高い酵素活性が認められた。このことにより、組換え体において本発明の遺伝子を発現することによって活性型の新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを大量に生産可能であることが示された。

【0055】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これ

ら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。なお、操作手順は特に記載しない限りMolecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook、Maniatisら、Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989))に記載の方法に従った。

【0056】

〔実施例1〕 酵素活性の測定

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性は基本的に、S. Kadowaki, et al., J Agric. Biol. Chem. 54, 97 (1990) に示された方法に従った。すなわち、ダンシル化されたヒトアシアロトランスフェリングリコペプチド (DNS-GP) を基質として用い、pH6.0のリン酸カリウム緩衝液中37℃で反応を行い、以下に示す条件で薄層クロマトグラフィー (TLC)、またはHPLCにより測定した。

【0057】

TLCでの分析条件

展開相：HPTLCシリカゲル60 (メルク)

溶媒：ブタノール：酢酸：水 = 2 : 1 : 1

検出：蛍光法による検出

HPLCでの分析条件

カラム：TSK-gel ODS80TM (東ソー)

移動相：25mMホウ酸ナトリウム緩衝液pH7.5+11%アセトニトリル

カラム温度：50℃

流速：0.5ml/分

検出器：蛍光検出器

活性の定義は上記HPLCによる測定で条件下で、1分間に1 μ molのダンシル化アセチルグルコサミンを生成する酵素量を1ユニットと定義した。

【0058】

〔実施例2〕 *Mucor hiemalis*の培養

500ml容坂口フラスコに100ml培地（ガラクトース2%、酵母エキス3%）を仕込み、スラント3～5分の1本分の*Mucor hiemalis*胞子を接種し、28℃で2日間培養を行った。mRNAの調製にはこの培養液を吸引ろ過して分離した菌体を用いた。

また酵素の調製については、上記培養液を培養後3リットル容ジャーファーマンターに2リットルの培地を仕込んだものに移し替え、28℃、回転数300～400rpm、通気量2リットル/分の条件で4日間培養を行った。

【0059】

〔実施例3〕新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの精製

実施例2で得られた培養液4リットル分（3リットル容ジャーファーマンター培養2回分）を吸引ろ過して菌体を分離し、限外ろ過（分子量13000カット）にて200mlまで濃縮したものを粗酵素液とした。これを5mMEDTAを含む10mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）にて平衡化したイオン交換クロマトグラフィー（ファルマシア社Q Sepharose FF、500ml）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、引き続き900mlの0M～0.3M食塩の線状勾配でエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを溶離した。活性画分に最終濃度が1M硫酸アンモニウム、5mMEDTAを含む50mMリン酸カリウム（pH7.0）となるように試薬を加え、同緩衝液にて平衡化した疎水クロマトグラフィー（東ソー社 Phenyl-TOYOPEARL 650S 200ml）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次に1mMのEDTAを含む硫酸アンモニウム600mlを用いて、1M～0Mの線状勾配でエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを溶離した。

【0060】

得られた溶離液を限外濾過膜（分子量カット13000）にて5mlまで濃縮し、引き続き0.15Mの食塩、1mMのEDTAを含む10mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）にて洗浄、脱塩した。次に同緩衝液にて平衡化したゲル濾過クロマトグラフィー（ファルマシア社Sephacryl S300）に載せ、同緩衝液にてエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを溶出した。

【0061】

活性画分を限外濾過膜（分子量カット13000）にて濃縮し、引き続き1mMのEDTAを含む10mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）にて洗浄、脱塩した。次に同緩衝液にて平衡化したヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー（東ソー社TSK-gel HA1000）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで1mMのEDTAを含むリン酸カリウム（pH7.0）30mlを用いて、0M～

0. 3 Mの線状勾配でエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを溶離した。

【0062】

活性画分を限外濾過膜（分子量カット13000）にて濃縮し、引き続きイミノジ酢酸にてpH 7.1に調製された25 mMピストリス緩衝液で洗浄、脱塩した。次に同緩衝液にて平衡化した等電点クロマトグラフィー（ファルマシア社MonoP）に通した。カラムを同緩衝液で洗浄し、次いで50 mlのイミノジ酢酸にてpH 3.9に調製された10%ポリバッファ-74（ファルマシア社）でエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを溶離した。

【0063】

活性画分を限外濾過膜（分子量カット13000）にて濃縮し、引き続き1 mMのEDTAを含む10 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）で洗浄、脱塩した。次に同緩衝液にて平衡化したイオン交換クロマトグラフィー（ファルマシア社MonoQ）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで30 mlの0 M～0.3 M食塩の線状勾配でエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを溶離した。

【0064】

活性画分を限外濾過膜（分子量カット13000）にて濃縮し、引き続き1 mMのEDTAを含む50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）で洗浄、脱塩したものを酵素サンプルとした。なお、各カラムクロマトグラフィーはファルマシア社FPLCを用いて行った。

タンパク質量はバイオラッド社プロテインアッセイキットを用いて、または吸光度（280 nm）により測定した。タンパク質の分子量、等電点はSDS-PAGE（15-25%グラジエント）、ゲル濾過クロマトグラフィー、IEF-PAGE等により測定した。

Native-SDSPAGE、IEF-SDSPAGEによる2次元電気泳動、及び上記クロマトグラフィーにおける各画分の活性とSDS-PAGE分析の結果から、SDS-PAGE上で少なくとも60 kDa（p60と称する）、及び14 kDa（p14）のバンドが検出された（図1）。

【0065】

〔実施例4〕 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの部分アミノ酸

配列の決定

部分アミノ酸配列分析は岩松（生化学 63、139～143(1991)）の方法により行なった。精製酵素を泳動用緩衝液（10%グリセロール、2.5%SDS、2%2-メルカプトエタノール、62mMトリス塩酸緩衝液（pH6.8））に懸濁させて、SDSポリアクリルアミド電気泳動に供した。泳動後、エレクトロブロットティングにより当該酵素をゲルより10cm x 7cmのPVD F膜（(ProBlot)アプライド バイオシステムズ）へ転写した。エレクトロブロットティング装置としてはザルトロット I I s 型（ザルトリウス社）を用い、エレクトロブロットティングを160mAで1時間行なった。

【0066】

転写後、当該酵素の転写された部分の膜を切り取り、その一部を直接気相プロテインシーケンサーで分析し、N末端アミノ酸配列を決定した。また残りの膜は約300 μ lの還元用緩衝液（8M グアニジン塩酸、0.5M トリス塩酸緩衝液（pH8.5）、0.3%EDTA、2%アセトニトリル）に浸し、1mgのジチオスレイトール（DTT）を加え、アルゴン下で25℃、約1時間の還元を行なった。これに3.0mgのモノヨード酢酸を0.5N水酸化ナトリウム液10 μ lに溶かしたものを加え、遮光下で20分攪拌した。PVD F膜をとりだし、2%アセトニトリルで充分洗浄した後、0.5%ポリビニルピロリドン-40を含む100mM酢酸に浸し、30分間静置した。こののち、PVD F膜を水で充分洗浄し、1mm四方に切断した膜を消化用緩衝液（8%アセトニトリル、9.0mMトリス塩酸緩衝液（pH9.0））に浸し、アクロモバクタープロテアーゼ I（和光純薬）を1pmol加え、室温で15時間消化した。その消化物をC18カラム（和光純薬 Wakosil AR II C18 300Å 2.0X150mm）を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー（日立 L6200）により分離し、各サブユニットについて7種類のペプチド断片を得た。

【0067】

ペプチドの溶出溶媒としてはA溶媒（0.05%トリフルオロ酢酸）、B溶媒（0.02%トリフルオロ酢酸を含む2-プロパノール/アセトニトリル 7:3）を用い、溶出は、B溶媒に関し2～50%の直線濃度勾配で、0.25mL/min

の流速のもと40分間溶出させることにより行なった。

新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ候補タンパク質から得られた断片化ペプチドについてアミノ酸配列分析を行なった。p60由来の断片をp60-AP、p14由来の断片をp14-APと命名した。得られた断片化ペプチドについてのアミノ酸配列決定試験を、気相プロテインシーケンサーPPSO-10型（島津製作所）を用いマニュアルに従って自動エドマン分解法により行なった。

得られた部分アミノ酸配列を表1に記す。

【0068】

【表1】

表1 エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ候補タンパクの部分アミノ酸配列

<u>p60</u>	
p60-AP-5	PSLQLQPDDK (配列番号17)
p60-AP-6	(K)SYRNPETYPtDQNIK (配列番号18)
p60-AP-8	(K)FNVSSVALQPRVK (配列番号19)
p60-AP-9	(K)MDRLFLCGgK (配列番号20)
	S
p60-AP-11	(K)GQRFNHRESHdVETEI (配列番号21)
	mal p 11lt
<u>p14</u>	
p14-AP-1	(K)EGYISSSGSIDLSLN (配列番号22)

【0069】

表1に記載のアミノ酸配列において、アルファベットの小文字で表されたアミノ酸は、アミノ酸配列上、不確定なアミノ酸を意味する。

部分アミノ酸配列に用いたアクロモバクタープロテアーゼIはリジン残基のカルボキシル基側を特異的に切断する為、以下の配列にN末端側に括弧書きでK（リジン）を記す。p60-AP-5はN末端アミノ酸配列であることが判明したため、括弧書きのK（リジン）を除いた。p60及びp14のアクロモバクタープロテアーゼI消化物については、C18カラム（ジールサイエンス Inertsil ODS-3 0.5x40mm）を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー（日立L6200）をオンライン

化した質量分析機（P E Sciex API-III）で質量分析も合わせて行なった。分析結果を表 2 に示す。

【0070】

【表 2】

表 2 60kDaペプチド (p 6 0) 及び14kDaペプチド(p14)の /Lys-C消化物LC/MS解析結果					
p 6 0	実測値	理論値	誤差	対応シーケンス	配列番号
AP-1:	950.50	950.47	+0.03	(K)NIQGNKYK	23
AP-2:	1160.50	1160.56	-0.06	(K)YSDYPPPPPK	24
AP-3:	733.25	733.41	-0.16	(K)LSLDASK	25
AP-4:	1838.50	1837.91	+0.59	(K)SYRNPEIYPTDQNIK	18
AP-5:	1141.00	1140.59	+0.41	()PSLQLQPD DK p60 N末端	17
	1157.50	1156.75	+0.75	(K)NTDGI FLNYWVK	26
AP-6:	1774.75	1774.94	-0.19	(K)GB*SLRYIYRTLLMK	27
AP-7:	701.50	701.39	+0.11	(K)LTVAB*H p60 C末端	28
	1544.50	1543.79	+0.71	(K)PQLLLTHDMAGGYK	29
	1621.00	1620.73	+0.27	(K)SMNELRDWTPDEK	30
AP-8:	1444.75	1444.83	-0.08	(K)FNVSSVALQPRVK	19
AP-9:	945.75	945.58	+0.17	(K)LAPVSFALK	31
	2655.00	2655.33	-0.33	(K)GQRFNHRESHDVETEISIPLYK	32
AP-10:	2206.75	2206.11	+0.64	(K)ITSSLD B*DHGAFLGGTSLI IK	33
AP-11:	2335.00	2335.16	-0.16	(K)NELFFKNTDGI FLNYWVK	34
p14	実測値	理論値	誤差	対応シーケンス	配列番号
AP-1:	888.75	888.45	+0.30	(K)IVIEAVNK	35
AP-2:	1392.50	1392.76	-0.26	()SSRIIQDLFWK p14 N末端	36
AP-3:	1541.50	1541.73	-0.23	(K)EGYISSSGSIDLSLN . . p14 C末端	22
	1608.50	1608.84	-0.34	(K)TDSSRIIQDLFWK	37

* B はシステイン、カルボキシメチルを表す。

【0071】

表 2 中、質量 (M+H+) において実測値が701.50を有する断片はp60-AP-7、実測値が1541.50を有する断片はp14-AP-3の分子量にほぼ一致し、そのC末端のアミノ酸がK (リジン) でないことが分かった。アクロモバクタープロテアーゼ I で消化した断片は、その酵素の基質特異性により、サブユニット自身のC末端断片以外の断片はK (リジン) がC末端アミノ酸残基となることから、この断片化ペプチドがp 6 0 及びp 1 4 のサブユニットのC末端断片であると推定した。

決定されたp 6 0 及びp 1 4 の部分アミノ酸配列をタンパク質データベースBLASTPを用いてホモロジー検索を行ったところ、得られた配列は新規であることが示

された。以上の結果からp60及びp14をエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ候補とし、遺伝子クローニングを行った。

【0072】

〔実施例5〕 *Mucor hiemalis*株cDNAライブラリーの作製

まず実施例2で得られた菌体5gよりISOGEN（ニッポンジーン社）を用いてトータルRNAを抽出した。抽出したトータルRNAからmRNA Purification Kit（Pharmacia Biotech）を用いてmRNAを精製した。mRNAよりSuperScript™ Lambda System for cDNA Synthesis and λ Cloningキット（GIBCO BRL）を用いてcDNAを合成し、Sal Iアダプターを接続した後、 λ ZipLox™ Sal I-Not I Arms（GIBCO BRL）に接続（ライゲーション）した。Gigapack III Gold Packaging Extract（Stratagene）を用いてパッケージングを行い、*E. coli* Y1090株に感染させcDNAライブラリーを完成させた。

【0073】

〔実施例6〕 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼcDNAのクローニング

部分アミノ酸配列p60-AP-5、p60-AP-6、p60-AP-11をもとにPCRプライマーを設計した。以下にその配列を示す。使用している記号は全てIUPAC-IUBに基づく。

p60-AP-5

p60-AP-5F 5' CARTTRCARCCNGAYGAYAA 3'（センスプライマー）（配列番号5）

p60-AP-6

p60-AP-6F 5' CCHACNGAYCARAAAYATYAA 3'（センスプライマー）（配列番号7）

p60-AP-6R 3' GGD TG NCTRGTYTTRTARTT 5'（アンチセンスプライマー）（配列番号8） p60-AP-11

p60-AP-11R 3' TTYCCDGTGCDAAARTTRGT 5'（アンチセンスプライマー）（配列番号10）

【0074】

*Mucor hiemalis*培養菌体よりフェノール法によりゲノムDNAを調製し、ゲノムPCR (94℃30秒、55℃1分、72℃1分、30サイクル) を行ったところ、特異的に増幅するバンドが確認された。p60についてはp60-AP-5Fとp60-AP-11Rとのプライマーの組み合わせで1.7 kb、p60-AP-5Fとp60-AP-6Rとのプライマーの組み合わせで1.5 kb、p60-AP-6Fとp60-AP-11Rとのプライマーの組み合わせで0.2 kbのPCR断片が得られた。この断片についてpCR-Scriptクローニングキット (Stratagene) を用いてpCR-Script Ampにサブクローニングを行なった。制限酵素消化による解析でp60-AP-5Fとp60-AP-11Rとの増幅断片がp60-AP-5Fとp60-AP-6R、及びp60-AP-6Fとp60-AP-11Rとの増幅断片を含んでいることが推定されたので、p60-AP-5Fとp60-AP-11Rとの増幅断片の塩基配列をアプライドバイオシステムズ社PRISM Ready Reactionキット、及び同社PRISM 377 DNAシーケンサーを用いて行った。遺伝子解析は日立ソフトウェアエンジニアリングDNASIS等を用いて行った。

【0075】

その結果、p60-AP-5Fとp60-AP-11Rとの増幅断片は、決定された他の部分アミノ酸配列を含んでいた。よってこのDNA断片はp60遺伝子の一部であることが判明したので、更にPCR増幅断片の内側の配列を元に新たにDNAプライマーを作成し、実施例5で得たmRNAを鋳型とし、Access RT-PCR System (Promega) を用いてRT-PCR (条件はゲノムPCRに同じ) を行った。新たに作成したDNAプライマーの配列は以下のとおりである。

p60-AP-5NF 5' CACTTAAGTCTATGAATGAG 3' (センスプライマー) (配列番号13)

p60-AP-6NR 3' CGATAGCTTTAGGTCTCTAA 5' (アンチセンスプライマー) (配列番号14)

【0076】

その結果、約1.2 kbの断片が増幅された。増幅された断片の塩基配列を決定したところイントロンを含まない断片が得られたので、この断片をプローブとしてcDNAのクローニングを行った。プローブはMegaprime DNA labelling system

s (Amersham) を用い α - ^{32}P dCTP (110TBq/mmol) でラベルを行った。

実施例 5 で得られた cDNA ライブラリーからの遺伝子全長の取得はプラークハイブリダイゼーションにより行った。その結果、20 万個プラークから 5 個のポジティブクローンが得られた。そのうち 4 個のクローンについて 2 次スクリーニングを実施してシングルプラークを得た。更にプラークから得られたファージ液を *E. coli* DH10B 株に感染させ、ファージから pZL1 由来のプラスミドを回収した。これらのクローンについて制限酵素解析を行い、上流領域を最も長く含むクローンについて塩基配列の解析を行なった。なお、このプラスミドを pZL-Endo と命名する (図 2)。

【0077】

挿入されていた約 2.3 kb の Sal I-Not I 断片について塩基配列の決定を行なった。すなわち、pBluescript II KS+ (Stratagene)、または pUC118 (宝酒造) に細分化した断片をサブクローニングし、さらにエキソヌクレアーゼ III およびマングベーンヌクレアーゼを用いた連続した欠失変異体を作製することにより、種々の変異欠失をもつプラスミドを作製し、DNA シークエンサーを用いて 2370bp からなる Sal I-Not I 断片の配列を決定した (図 3～4、配列番号 1)。

【0078】

予想される構造遺伝子の領域の解析を行なったところ、744 個から構成されるアミノ酸配列 (推定分子量 85 kDa) をコードするオープンリーディングフレームが存在し (図 5～7、配列番号 2)。このアミノ酸配列は決定した p60、及び p14 の部分アミノ酸配列の全てを含んでいることがわかった。p60-AP-5 の N 末端側のとなりのアミノ酸がリジンではなくメチオニンであったことから、このメチオニンをコードする ATG が翻訳のスタートコドンであることを確認した。よって、本発明の酵素の N 末端はプロリンであることが明らかにされた。

【0079】

一方、質量分析の結果と同様に、p14-AP-3 が本発明の遺伝子によりコードされるタンパク質の C 末端であることがわかった。また質量分析の結果とも併せ p14 の N 末端の少なくとも一種は、配列番号 2 に示しているアミノ酸配列の 628 番目のセリンであると推定した。

以上のことから、本発明の遺伝子は5'領域にp60、3'領域にp14をコードすることがわかった。アミノ酸配列からN末端シグナル配列は見い出されなかったため、本発明の酵素は細胞内タンパク質であると考えられるが、図1において複数のバンドが存在することから、本発明の酵素は、菌体の溶菌が原因と思われるタンパク質分解酵素の作用を受けていると考えられた。

【0080】

【実施例7】 エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の発現ベクターの構築

本実施例では、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子、及びGAPDH遺伝子プロモーター-PGKターミネーターを含む、TRP1遺伝子を相補するサッカロミセス・セレビスエ組み込み用発現ベクターの構築を行った。

実施例3で確認した744アミノ酸をコードしているオープンリーディングフレームを得るために、両端にNot Iサイトを付加したN末端、C末端のアミノ酸配列に相当するDNA配列に基づくDNAプライマーを合成し、pZL-Endoを鋳型としてPCRを行ない増幅断片を得た。以下にセンス、アンチセンスのプライマー配列を記す。

【0081】

Endo-Not-F (センスプライマー)

5' GGGGCGGCCGCTTTTATTTTACATAAATATGCCTTCACTTC 3' (配列番号15)

Endo-Not-R (アンチセンスプライマー)

5' CCCGCGGCCGCTAGTTTAATGACAAATCTATGCTACC 3' (配列番号16)

増幅された断片をアガロースゲル電気泳動にて分離後、Prep-A-Gene DNA Purification System (Bio-Rad) を用いて回収、精製した。更にこの断片をNot Iで消化後、精製し、pBluescript II KS+のNot Iに挿入し、pBlue-Endo-Notを作製した。

【0082】

新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子はカビ由来の遺伝子であることから酵母での発現が適していると考え、サッカロミセス・セレビスエのグ

リセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子のプロモーター、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) 遺伝子ターミネーター、及びトリプトファン合成遺伝子 TRP1 遺伝子を含む、trp1 遺伝子を選択マーカーとするサッカロミセス・セレビスエ用の発現プラスミドを、発現ベクター pG-3 (Methods in Enzymology Vol. 194 p.389) をベースに作製した。pG-3 を BamH I で消化し、クレノウ処理により平滑末端とし、Not I リンカーを付加して pG-3-Not を作製した。

前述の pBlue-Endo-Not を Not I で消化し、約 2.3 kb の挿入断片をアガロースゲル電気泳動により分離精製し、これを pG-3-Not の Not I 部位に挿入し、pGEndo-SC を構築した (図 8)。

【0083】

〔実施例 8〕新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼのサッカロミセス・セレビスエでの発現

宿主として酵母サッカロミセス・セレビスエ YPH 500 株 (Strategene) の pep4 遺伝子破壊株を用いた。pep4 遺伝子破壊株については Sikorski, R. S. と Hietzer, P. の方法 (Genetics 122 巻 19-27 (1989)) により作成した。10 μg の pGEndo-SC を用いて上記株を形質転換した。形質転換は酢酸リチウム法 (W0/95/32289 号参照) により行い、形質転換体はトリプトファンを含まない培地プレート (酵母ニトロゲンベース 0.67%、カザミノ酸 0.5%、グルコース 1%) にて選択した。

【0084】

得られた形質転換について、菌体内の新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの活性確認を行なった。5 mL の YPD 培地 (酵母エキス 1%、ポリペプトン 2%、グルコース 2%) 中、30℃ で 2 日間培養した菌について、1500 g、5 分間、4℃ で遠心を行い培養上清と菌体を分離し、菌体は蒸留水で洗浄した。菌体に、50mM リン酸カリウムバッファー (pH 6.0) と 5mM EDTA との混合液を 100 μリットル加えよく懸濁した。更に 50 mg のガラスビーズを加え、激しく攪拌した後遠心し、上清を細胞抽出液とした。

【0085】

活性測定は、基質として DNS-GP を用いて TLC または HPLC で行った。TLC での結果

を図9に示す。Mucor hiemalis培養上清より精製した酵素と反応させたサンプルと同様に、pGEndo-SC生成物であるダンシル化アセチルグルコサミン(DNS-GlcNAc)と一致するピークが得られた。一方、ネガティブコントロールである、pG-3-No tで形質転換した株の培養上清を用いたものからはDNS-GlcNAcに対応するピークは検出されなかった。そこでpGEndo-SCの細胞抽出液を10倍濃縮し、脱塩を行ったものを粗酵素として、DNS-GPと反応させ、DNS-GlcNAcに対応するピークを上記条件のHPLCを用いて分取した。分取したサンプルをエバポレーターで濃縮し、マスペクトル分析を行った。その結果、分取したサンプルの分析結果がDNS-GlcNAcの分析結果と一致することを確認した。従って、pGEndo-SCの挿入断片にコードされている遺伝子産物は、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼであることが分かった。

表3に培地1 mLあたりの本新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの活性(生産量)を示す。この活性はMucor hiemalisの値の48倍であった。

【0086】

【表3】

表3 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの活性

	活性 (ユニット/リットル)
M.hiemalis培養上清	0.9
エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ 遺伝子導入S. cerevisiae培養液注)	43.2

注)培養液を集菌後、菌体をガラスビーズで破碎しその遠心分離後の上清の活性を測定し、その値から培養液当たりの活性を算出した。

【0087】

【発明の効果】

本発明により、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及びエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの製造方法が提供される。

本発明の遺伝子を含有するベクターを宿主に導入し、遺伝子を発現させること

によってエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを効率的、大量に生産することができる。

本発明の酵素は、糖鎖の分析、解析、及び糖鎖の改変を行う上で産業上重要な酵素であり、本発明によって得られた形質転換体は本酵素を著量に生産し、これら酵素を用いる産業界に大いに貢献することができる。

【0088】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2369

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ムコール・ヒエマリス (*Mucor hiemalis*)

株名：

配列

GTCGACCCAC GCGTCCGCGG ACGCGTGGGC GGACGCGTGG GCGGACGCGT GGGTTTTATT	60
TTACATAAAT ATGCCTTCAC TTCAATTGCA ACCTGATGAC AAACCTAGCAC CTGTTTCTTT	120
TGCACTTAAG TCTATGAATG AGTTGAGGGA CTGGACGCCA GACGAAAAGA TAAAGTTTAA	180
CGTTTCAAGC GTGGCACTAC AGCCTCGTGT GAAAAACGCC CTGAAACCTC AATTATTGTT	240
AACTCATGAT ATGGCAGGAG GATATAAAGA AGATAAAAAT ATTCAAGGAA ACAATTATAA	300
AGACATTTAT AACATTCAAT ATTGGCATT TTTGTATATT TCTCTCATGA	360
GCGAGTTAGC ATTCCTCCAG TCAATTGGAC AAATGCTTGT CATAGAAATG GTGTAAAGTG	420
TTTAGGTACT TTTTGTAGTAG AAGGAAATAA CCAAATGCAT GAAATGGAAG CCTTGCTTCA	480
CGGTCCACCT TACTTAATA AACTGACGA CCCTATGAGA TTATGGAGTC CGTATTATGC	540
AGACCAATTA GTTGCTATTG CTAAACACTA TGGTTTTGAT GGCTGGTTGT TCAATATTGA	600
ATGCGAATTC TTTCCTTTTC CTACAAATCC AAAATTCAAA GCTGAAGAGT TGGCAAAGTT	660
TCTACACTAT TTAAAGGAAA AATTGCATAA CGAAATACCT GGATCTCAAC TCATTTGGTA	720

CGACAGCATG	ACAAATGAAG	GAGAAATCCA	CTGGCAGAAC	CAGCTCACAT	GGAAAAATGA	780
GTTATTTTTT	AAAAACACGG	ATGGTATTTT	TTTGAATTAT	TGGTGGAATA	AAGAATACCC	840
TGAAATGGCG	CGTAGAGTAG	CTGAAGGAAT	AGGTAGATCA	GGTTTAGAAG	TTTATTTTGG	900
TACAGATGTA	TGGGGAAGGC	ATACTTATGG	TGGCGGTGGT	TTCAAATCAT	ATAAGGGTGT	960
AAAAACTGCC	TACTCTGCAA	TGACATCTTC	TGCATTATTT	GGTATGGCAT	GGACATACGA	1020
GCATTTTCGAA	AAGTCTGAAT	TTGAAAAGAT	GGATCGTTTG	TTTTGGTGTG	GTGGTAAATA	1080
CTCTGACTAT	CCTCCCCCAC	CTCCTAAAAA	CCCAGATGAC	GAAAAAGAAG	TAGAAAGCGA	1140
TGATAGTGAA	GATGAGCTCA	TGTACGGACA	CAAGAAAGGT	ATTGCTGACA	CGGTAGAATC	1200
TATTCCTGTA	CCAGGAACAG	ATTGGTTTGT	TACCAATTTT	GATAGGGGGT	TTGGAAATAG	1260
GTTTTATTAT	AGAGGAAAGA	GATTACTTTC	TCAGCCTTGG	TCCCATTAT	CGCATCAAGC	1320
TATTCTCCCC	AATAAAAGCT	ATCGAAATCC	AGAGATTTAT	CCCACTGATC	AAAACATTAA	1380
AATCACTAGT	TCTCTCGATT	GCGATCATGG	AGCTTTTCTT	GGTGGAACCT	CGCTTATTAT	1440
CAAAGGCCAA	CGTTTCAATC	ATAGAGAATC	GCATGATGTT	GAAACTGAAA	TTAGTATACC	1500
TCTGTATAAG	CTTTCATTAG	ATGCTAGTAA	AGGATGCTCA	TTGCGTTATA	TTTATAGAAC	1560
TTTGTTGATG	AAAGATGTAA	AGTTGACAGT	AGCATGTCAC	TTTTCGTTAA	AAACAAACGA	1620
CTCAGTTAAT	TTCTTCAAGG	TATGGCAGCC	AGATGAAAAT	TTCTCTTTTG	AATATGATGA	1680
TGGAATGAGA	GCCACTGTTA	CAACTGAAAA	TTCTACCGAA	AGCAGATGCT	TTTTATTACG	1740
TACAACAGAA	GAAGATACAG	GAGAAAATGA	TTGGATAACA	AAAACTATTA	ATGTGCCTGC	1800
TGTTCCAGAA	GGAAGTCAAT	TATACATTAC	AAGACTTGAA	GTGAGCGTAG	TATTAGATAC	1860
AGCTGGTTTA	GTAGGTCTTG	TTAATCAAGT	TATTGCTTGC	TTGGGATATA	TTAGCATCAT	1920
ACCAACTATA	AATTCTGGAA	TAAAAACAGA	TTCATCACGC	ATTATTCAGG	ATCTCTTTTG	1980
GAAAGATCAG	AAATATACCA	AAATCGGAAA	AGAAAGTTTA	GACGACATAG	CTCAAGAAGA	2040
AGTTCATAGA	TATTATGGAA	CATTGAACTG	GGAAAACACA	GCAAATGTAG	TAAACGCTTG	2100
GGAGGAAATA	GATTACTACA	ACGTTTTTTA	CAAAGAAAGT	GACGACTCTG	CAACTCGCAT	2160
CTTTTTAGGA	ACAGCATTCT	GTAATCAATT	TCGTGTATCT	GGTTTAGATA	TTATTTTATC	2220
TAAGCTACCA	AAGATAGTTA	TTGAAGCTGT	TAACAAAGAA	GGATACATCT	CTTCAAGTGG	2280
TAGCATAGAT	TTGTCATTAA	ACTAGGACTT	GAAATAAAAT	ATTATGATAA	AGAAAAAAA	2340
AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAG	GGCGGCCGC				2369

•

AAC ATT CAA TAT TGG CAT TTA GCT GAT ACT TTT GTA TAT TTC TCT CAT	288
Asn Ile Gln Tyr Trp His Leu Ala Asp Thr Phe Val Tyr Phe Ser His	
85 90 95	
GAG CGA GTT AGC ATT CCT CCA GTC AAT TGG ACA AAT GCT TGT CAT AGA	336
Glu Arg Val Ser Ile Pro Pro Val Asn Trp Thr Asn Ala Cys His Arg	
100 105 110	
AAT GGT GTA AAG TGT TTA GGT ACT TTT TTA GTA GAA GGA AAT AAC CAA	384
Asn Gly Val Lys Cys Leu Gly Thr Phe Leu Val Glu Gly Asn Asn Gln	
115 120 125	
ATG CAT GAA ATG GAA GCC TTG CTT CAC GGT CCA CCT TTA CTT AAT AAC	432
Met His Glu Met Glu Ala Leu Leu His Gly Pro Pro Leu Leu Asn Asn	
130 135 140	
ACT GAC GAC CCT ATG AGA TTA TGG AGT CCG TAT TAT GCA GAC CAA TTA	480
Thr Asp Asp Pro Met Arg Leu Trp Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Gln Leu	
145 150 155 160	
GTT GCT ATT GCT AAA CAC TAT GGT TTT GAT GGC TGG TTG TTC AAT ATT	528
Val Ala Ile Ala Lys His Tyr Gly Phe Asp Gly Trp Leu Phe Asn Ile	
165 170 175	
GAA TGC GAA TTC TTT CCT TTT CCT ACA AAT CCA AAA TTC AAA GCT GAA	576
Glu Cys Glu Phe Phe Pro Phe Pro Thr Asn Pro Lys Phe Lys Ala Glu	
180 185 190	
GAG TTG GCA AAG TTT CTA CAC TAT TTT AAG GAA AAA TTG CAT AAC GAA	624
Glu Leu Ala Lys Phe Leu His Tyr Phe Lys Glu Lys Leu His Asn Glu	
195 200 205	
ATA CCT GGA TCT CAA CTC ATT TGG TAC GAC AGC ATG ACA AAT GAA GGA	672
Ile Pro Gly Ser Gln Leu Ile Trp Tyr Asp Ser Met Thr Asn Glu Gly	
210 215 220	
GAA ATC CAC TGG CAG AAC CAG CTC ACA TGG AAA AAT GAG TTA TTT TTT	720
Glu Ile His Trp Gln Asn Gln Leu Thr Trp Lys Asn Glu Leu Phe Phe	

225	230	235	240	
AAA AAC ACG GAT GGT ATT TTT TTG AAT TAT TGG TGG AAA AAA GAA TAC				768
Lys Asn Thr Asp Gly Ile Phe Leu Asn Tyr Trp Trp Lys Lys Glu Tyr				
245	250	255		
CCT GAA ATG GCG CGT AGA GTA GCT GAA GGA ATA GGT AGA TCA GGT TTA				816
Pro Glu Met Ala Arg Arg Val Ala Glu Gly Ile Gly Arg Ser Gly Leu				
260	265	270		
GAA GTT TAT TTT GGT ACA GAT GTA TGG GGA AGG CAT ACT TAT GGT GGC				864
Glu Val Tyr Phe Gly Thr Asp Val Trp Gly Arg His Thr Tyr Gly Gly				
275	280	285		
GGT GGT TTC AAA TCA TAT AAG GGT GTA AAA ACT GCC TAC TCT GCA ATG				912
Gly Gly Phe Lys Ser Tyr Lys Gly Val Lys Thr Ala Tyr Ser Ala Met				
290	295	300		
ACA TCT TCT GCA TTA TTT GGT ATG GCA TGG ACA TAC GAG CAT TTC GAA				960
Thr Ser Ser Ala Leu Phe Gly Met Ala Trp Thr Tyr Glu His Phe Glu				
305	310	315	320	
AAG TCT GAA TTT GAA AAG ATG GAT CGT TTG TTT TGG TGT GGT GGT AAA				1008
Lys Ser Glu Phe Glu Lys Met Asp Arg Leu Phe Trp Cys Gly Gly Lys				
325	330	335		
TAC TCT GAC TAT CCT CCC CCA CCT CCT AAA AAC CCA GAT GAC GAA AAA				1056
Tyr Ser Asp Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Lys Asn Pro Asp Asp Glu Lys				
340	345	350		
GAA GTA GAA AGC GAT GAT AGT GAA GAT GAG CTC ATG TAC GGA CAC AAG				1104
Glu Val Glu Ser Asp Asp Ser Glu Asp Glu Leu Met Tyr Gly His Lys				
355	360	365		
AAA GGT ATT GCT GAC ACG GTA GAA TCT ATT CCT GTA CCA GGA ACA GAT				1152
Lys Gly Ile Ala Asp Thr Val Glu Ser Ile Pro Val Pro Gly Thr Asp				
370	375	380		
TGG TTT GTT ACC AAT TTT GAT AGG GGG TTT GGA AAT AGG TTT TAT TAT				1200



690	695	700	
AAT CAA TTT CGT GTA TCT GGT TTA GAT ATT ATT TTA TCT AAG CTA CCA			2160
Asn Gln Phe Arg Val Ser Gly Leu Asp Ile Ile Leu Ser Lys Leu Pro			
705	710	715	720
AAG ATA GTT ATT GAA GCT GTT AAC AAA GAA GGA TAC ATC TCT TCA AGT			2208
Lys Ile Val Ile Glu Ala Val Asn Lys Glu Gly Tyr Ile Ser Ser Ser			
	725	730	735
GGT AGC ATA GAT TTG TCA TTA AAC TAG			2235
Gly Ser Ile Asp Leu Ser Leu Asn			
740			

【0090】

配列番号 : 3

配列の長さ : 744

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Met	Pro	Ser	Leu	Gln	Leu	Gln	Pro	Asp	Asp	Lys	Leu	Ala	Pro	Val	Ser
1				5						10				15	
Phe	Ala	Leu	Lys	Ser	Met	Asn	Glu	Leu	Arg	Asp	Trp	Thr	Pro	Asp	Glu
				20						25				30	
Lys	Ile	Lys	Phe	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Ala	Leu	Gln	Pro	Arg	Val	Lys
				35						40				45	
Asn	Ala	Leu	Lys	Pro	Gln	Leu	Leu	Leu	Thr	His	Asp	Met	Ala	Gly	Gly
				50						55				60	
Tyr	Lys	Glu	Asp	Lys	Asn	Ile	Gln	Gly	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asp	Ile	Tyr
				65						70				75	80
Asn	Ile	Gln	Tyr	Trp	His	Leu	Ala	Asp	Thr	Phe	Val	Tyr	Phe	Ser	His

85	90	95
Glu Arg Val Ser Ile Pro Pro Val Asn Trp Thr Asn Ala Cys His Arg		
100	105	110
Asn Gly Val Lys Cys Leu Gly Thr Phe Leu Val Glu Gly Asn Asn Gln		
115	120	125
Met His Glu Met Glu Ala Leu Leu His Gly Pro Pro Leu Leu Asn Asn		
130	135	140
Thr Asp Asp Pro Met Arg Leu Trp Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Gln Leu		
145	150	155
Val Ala Ile Ala Lys His Tyr Gly Phe Asp Gly Trp Leu Phe Asn Ile		
165	170	175
Glu Cys Glu Phe Phe Pro Phe Pro Thr Asn Pro Lys Phe Lys Ala Glu		
180	185	190
Glu Leu Ala Lys Phe Leu His Tyr Phe Lys Glu Lys Leu His Asn Glu		
195	200	205
Ile Pro Gly Ser Gln Leu Ile Trp Tyr Asp Ser Met Thr Asn Glu Gly		
210	215	220
Glu Ile His Trp Gln Asn Gln Leu Thr Trp Lys Asn Glu Leu Phe Phe		
225	230	235
Lys Asn Thr Asp Gly Ile Phe Leu Asn Tyr Trp Trp Lys Lys Glu Tyr		
245	250	255
Pro Glu Met Ala Arg Arg Val Ala Glu Gly Ile Gly Arg Ser Gly Leu		
260	265	270
Glu Val Tyr Phe Gly Thr Asp Val Trp Gly Arg His Thr Tyr Gly Gly		
275	280	285
Gly Gly Phe Lys Ser Tyr Lys Gly Val Lys Thr Ala Tyr Ser Ala Met		
290	295	300
Thr Ser Ser Ala Leu Phe Gly Met Ala Trp Thr Tyr Glu His Phe Glu		
305	310	315
		320

Lys Ser Glu Phe Glu Lys Met Asp Arg Leu Phe Trp Cys Gly Gly Lys

325

330

335

Tyr Ser Asp Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Lys Asn Pro Asp Asp Glu Lys

340

345

350

Glu Val Glu Ser Asp Asp Ser Glu Asp Glu Leu Met Tyr Gly His Lys

355

360

365

Lys Gly Ile Ala Asp Thr Val Glu Ser Ile Pro Val Pro Gly Thr Asp

370

375

380

Trp Phe Val Thr Asn Phe Asp Arg Gly Phe Gly Asn Arg Phe Tyr Tyr

385

390

395

400

Arg Gly Lys Arg Leu Leu Ser Gln Pro Trp Ser His Leu Ser His Gln

405

410

415

Ala Ile Leu Pro Asn Lys Ser Tyr Arg Asn Pro Glu Ile Tyr Pro Thr

420

425

430

Asp Gln Asn Ile Lys Ile Thr Ser Ser Leu Asp Cys Asp His Gly Ala

435

440

445

Phe Leu Gly Gly Thr Ser Leu Ile Ile Lys Gly Gln Arg Phe Asn His

450

455

460

Arg Glu Ser His Asp Val Glu Thr Glu Ile Ser Ile Pro Leu Tyr Lys

465

470

475

480

Leu Ser Leu Asp Ala Ser Lys Gly Cys Ser Leu Arg Tyr Ile Tyr Arg

485

490

495

Thr Leu Leu Met Lys Asp Val Lys Leu Thr Val Ala Cys His Phe Ser

500

505

510

Leu Lys Thr Asn Asp Ser Val Asn Phe Phe Lys Val Trp Gln Pro Asp

515

520

525

Glu Asn Phe Ser Phe Glu Tyr Asp Asp Gly Met Arg Ala Thr Val Thr

530

535

540

Thr Glu Asn Ser Thr Glu Ser Arg Cys Phe Leu Leu Arg Thr Thr Glu

545	550	555	560
Glu Asp Thr Gly Glu Asn Asp Trp Ile Thr Lys Thr Ile Asn Val Pro			
565	570	575	
Ala Val Pro Glu Gly Ser Gln Leu Tyr Ile Thr Arg Leu Glu Val Ser			
580	585	590	
Val Val Leu Asp Thr Ala Gly Leu Val Gly Leu Val Asn Gln Val Ile			
595	600	605	
Ala Cys Leu Gly Tyr Ile Ser Ile Ile Pro Thr Ile Asn Ser Gly Ile			
610	615	620	
Lys Thr Asp Ser Ser Arg Ile Ile Gln Asp Leu Phe Trp Lys Asp Gln			
625	630	635	640
Lys Tyr Thr Lys Ile Gly Lys Glu Ser Leu Asp Asp Ile Ala Gln Glu			
645	650	655	
Glu Val His Arg Tyr Tyr Gly Thr Leu Asn Trp Glu Asn Thr Ala Asn			
660	665	670	
Val Val Asn Ala Trp Glu Glu Ile Asp Tyr Tyr Asn Val Phe Tyr Lys			
675	680	685	
Glu Ser Asp Asp Ser Ala Thr Arg Ile Phe Leu Gly Thr Ala Phe Cys			
690	695	700	
Asn Gln Phe Arg Val Ser Gly Leu Asp Ile Ile Leu Ser Lys Leu Pro			
705	710	715	720
Lys Ile Val Ile Glu Ala Val Asn Lys Glu Gly Tyr Ile Ser Ser Ser			
725	730	735	
Gly Ser Ile Asp Leu Ser Leu Asn			
740			

【 0 0 9 1 】

配列番号 : 4

配列の長さ : 10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Pro Ser Leu Gln Leu Gln Pro Asp Asp Lys

1 5 10

【0092】

配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸(合成DNA)

配列

CARTTRC ARC CNGAYGAYAA

20

【0093】

配列番号：6

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Tyr Arg Asn Pro Glu Ile Tyr Pro Thr Asp Gln Asn Ile Lys

1 5 10 15

【0094】

配列番号：7

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

CCHACNGAYC ARAAYATYAA

20

【0095】

配列番号 : 8

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

TTRATRTTYT GRTCNGTDGG

20

【0096】

配列番号 : 9

配列の長さ : 16

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Gly Gln Arg Phe Asn His Arg Glu Ser His Asp Val Glu Thr Glu Ile

1

5

10

15

【0097】

配列番号：10

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸(合成DNA)

配列

TGRTTTRAADC GYTGDCCYTT

20

【0098】

配列番号：11

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸(合成DNA)

配列

ATGCCTTCAC TTCAATTGCA ACC

23

【0099】

配列番号：12

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸(合成DNA)

配列

CTAGTTTAAT GACAAATCTA TGC

23

【0100】

配列番号 : 13

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸(合成DNA)

配列

CACTTAAGTC TATGAATGAG

20

【0101】

配列番号 : 14

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸(合成DNA)

配列

AATCTCTGGA TTTCGATAGC

20

【0102】

配列番号 : 15

配列の長さ : 41

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸(合成DNA)

配列

GGGGCGGCCG CTTTATTTT ACATAAATAT GCCTTCACTT C

41

【0103】

配列番号：16

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸(合成DNA)

配列

CCCGCGGCCG CCTAGTTTAA TGACAAATCT ATGCTACC

38

【0104】

配列番号：17

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Pro Ser Leu Gln Leu Gln Pro Asp Asp Lys

1

5

10

【0105】

配列番号：18

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Ser Tyr Arg Asn Pro Glu Ile Tyr Pro Thr Asp Gln Asn Ile Lys

1 5 10 15

【0106】

配列番号 : 19

配列の長さ : 16

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Phe Asn Val Ser Ser Val Ala Leu Gln Pro Arg Val Lys

1 5 10

【0107】

配列番号 : 20

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴

存在位置 : 2

他の情報 : Xaa=Met or Ser

配列

Lys Xaa Asp Arg Leu Phe Leu Cys Gly Gly Lys

1 5 10

【0108】

配列番号 : 21

配列の長さ : 17

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

存在位置：2

他の情報：Xaa=Gly or Met

配列の特徴

存在位置：3

他の情報：Xaa=Gln or Ala

配列の特徴

存在位置：4

他の情報：Xaa=Arg or Leu

配列の特徴

存在位置：6

他の情報：Xaa=Asn or Pro

配列の特徴

存在位置：8

他の情報：Xaa=Arg or Leu

配列の特徴

存在位置：9

他の情報：Xaa=Glu or Leu

配列の特徴

存在位置：10

他の情報：Xaa=Ser or Leu

配列の特徴

存在位置：11

他の情報：Xaa=His or Thr

配列

Lys Xaa Xaa Xaa Phe Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Val Glu Thr Glu

1	5	10	15
Ile			

【0109】

配列番号：22

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Glu Gly Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ile Asp Leu Ser Leu Asn

1	5	10	15
---	---	----	----

【0110】

配列番号：23

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Asn Ile Gln Gly Asn Asn Tyr Lys

1	5
---	---

【0111】

配列番号：24

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Tyr Ser Asp Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Lys

1 5 10

【0112】

配列番号 : 25

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Leu Ser Leu Asp Ala Ser Lys

1 5

【0113】

配列番号 : 26

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Asn Thr Asp Gly Ile Phe Leu Asn Tyr Trp Trp Lys

1 5 10

【0114】

配列番号 : 27

配列の長さ : 15

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

存在位置：3

他の情報：Carboxymethyl

配列

Lys Gly Cys Ser Leu Arg Tyr Ile Tyr Arg Thr Leu Leu Met Lys

1

5

10

15

【0115】

配列番号：28

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

存在位置：6

他の情報：Carboxymethyl

配列

Lys Leu Thr Val Ala Cys His

1

5

【0116】

配列番号：29

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Pro Gln Leu Leu Leu Thr His Asp Met Ala Gly Gly Tyr Lys

1 5 10 15

【0117】

配列番号 : 30

配列の長さ : 14

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Ser Met Asn Glu Leu Arg Asp Trp Thr Pro Asp Glu Lys

1 5 10

【0118】

配列番号 : 31

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Leu Ala Pro Val Ser Phe Ala Leu Lys

1 5 10

【0119】

配列番号 : 32

配列の長さ : 23

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Gly Gln Arg Phe Asn His Arg Glu Ser His Asp Val Glu Thr Glu

1 5 10 15

Ile Ser Ile Pro Leu Tyr Lys

20

【0120】

配列番号 : 33

配列の長さ : 22

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴

存在位置 : 8

他の情報 : Carboxymethyl

配列

Lys Ile Thr Ser Ser Leu Asp Cys Asp His Gly Ala Phe Leu Gly Gly

1 5 10 15

Thr Ser Leu Ile Ile Lys

20

【0121】

配列番号 : 34

配列の長さ : 19

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Asn Glu Leu Phe Phe Lys Asn Thr Asp Gly Ile Phe Leu Asn Tyr

1 5 10 15

Trp Trp Lys

【0122】

配列番号 : 35

配列の長さ : 9

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Ile Val Ile Glu Ala Val Asn Lys

1

5

【0123】

配列番号 : 36

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Ser Ser Arg Ile Ile Gln Asp Leu Phe Trp Lys

1

5

10

【0124】

配列番号 : 37

配列の長さ : 14

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Thr Asp Ser Ser Arg Ile Ile Gln Asp Leu Phe Trp Lys

1

5

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの精製結果を示す電気泳動写真である。

【図 2】

新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全長を含むpZL-Endoの制限酵素地図である。

【図 3】

新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全長を含むpZL-EndoのSal I-Not I部位に挿入された断片の全塩基配列を示した図である。

【図 4】

新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全長を含むpZL-EndoのSal I-Not I部位に挿入された断片の全塩基配列を示した図である（図 3 の続き）。

【図 5】

新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列、および該アミノ酸をコードするDNAの塩基配列を表す図である。

【図 6】

新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列、および該アミノ酸をコードするDNAの塩基配列を表す図である（図 5 の続き）。

【図 7】

新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列、および該アミノ酸をコードするDNAの塩基配列を表す図である（図 6 の続き）。

【図 8】

新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子を含むサッカロミセス・セレピシエ用の発現ベクター pGEndo-SC の構造を表す図である。

【図 9】

新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子が導入された酵母での該酵素の発現を示すクロマトグラフの写真である。

【書類名】 図面

【図 1】

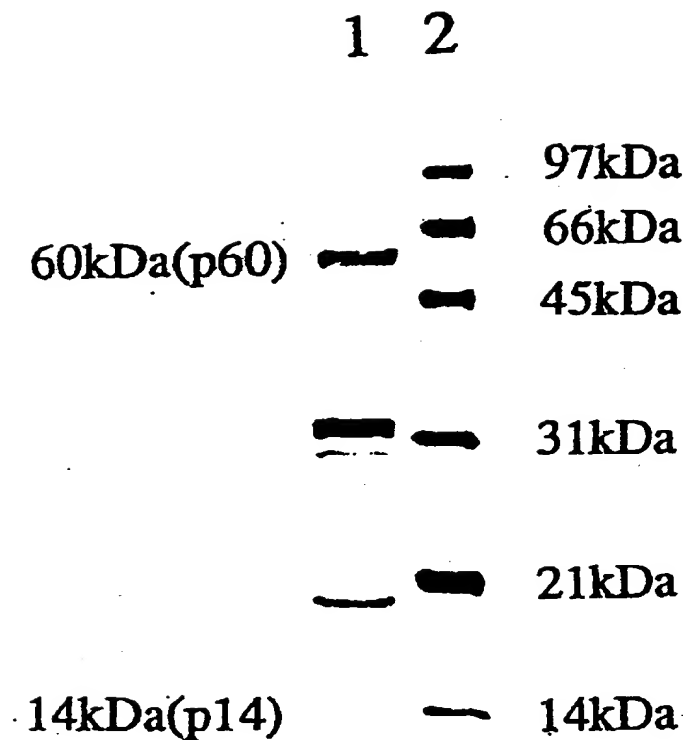


図 1 エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの精製結果

(15-25%グラジエントSDS-PAGE)

レーン1 : *Mucor hiemalis*由来精製エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ

レーン2 : 分子量マーカー

【図 2】

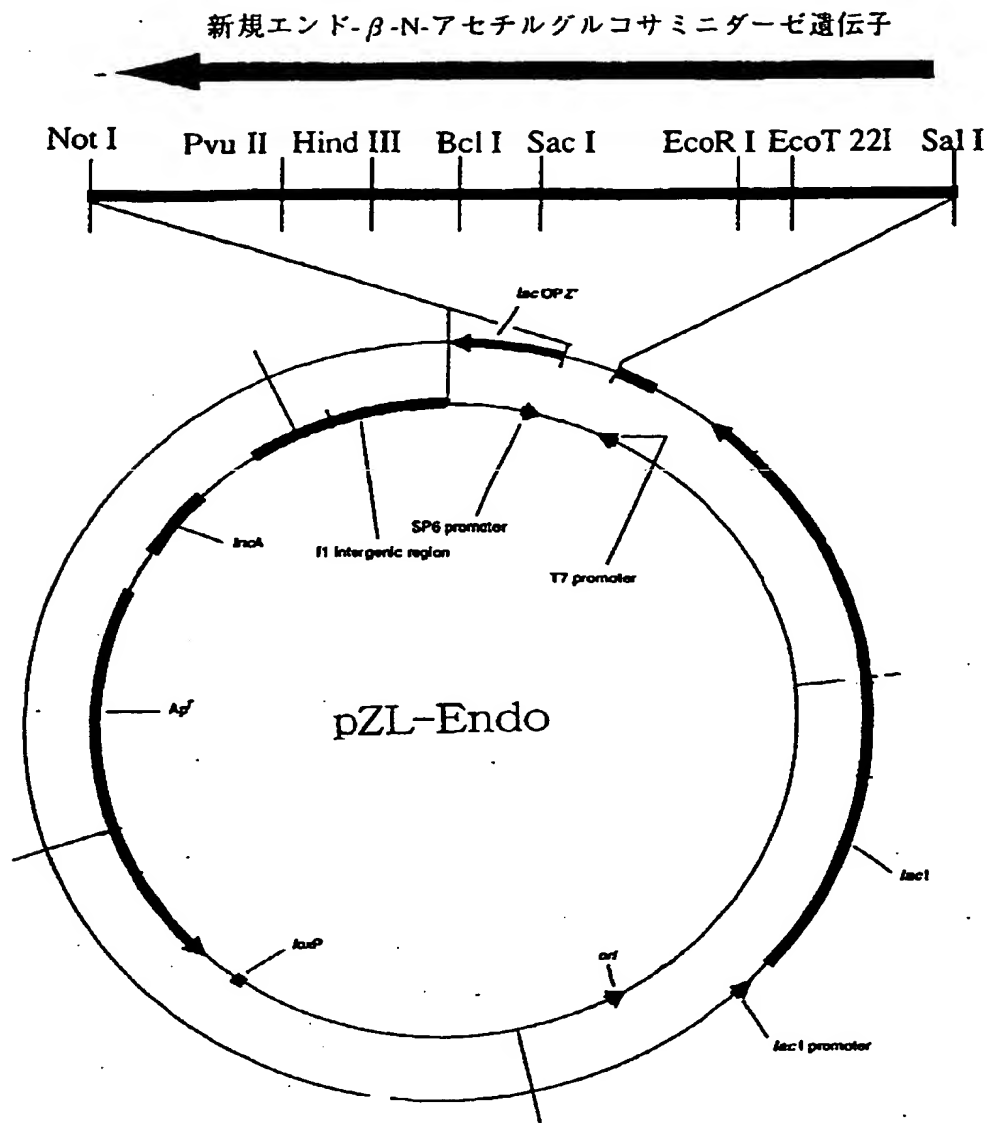


図 2 新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全長を含むpZL-Endoの制限酵素地図

【図3】

10	20	30	40	50	60
GTCGACCCAC	GCGTCCGGG	ACGCGTGGC	GGACGCGTG	GCGGACCGT	GGTTTTATT
70	80	90	100	110	120
TTACATAAAT	ATGCCTTAC	TTCAATTGCA	ACCTGATGAC	AACTAGCAC	CTGTTTCTT
130	140	150	160	170	180
TGCACTTAAG	TCTATGAATG	AGTTGAGGA	CTGGACGCCA	GACGAAAAGA	TAAAGTTTAA
190	200	210	220	230	240
CGTTTCAAGC	GTGGCACTAC	AGCCTCGTGT	GAAAAACGCC	CTGAAACCTC	AATTATTGTT
250	260	270	280	290	300
AACTCATGAT	ATGGCAGGAG	GATATAAAGA	AGATAAAAAT	ATTCAAGGAA	ACAATTATTA
310	320	330	340	350	360
AGACATTIAT	AACATTCAAT	ATTGGCATTT	AGCTGATACT	TTTGTATATT	TCTCTCATGA
370	380	390	400	410	420
GCGAGTTAGC	ATTCTCCAG	TCAATTGGAC	AAATGCTTGT	CATAGAAATG	GTGTAAAGTG
430	440	450	460	470	480
TTTAGGTAAT	TTTTTAGTAG	AAGGAAATAA	CCAAATGCAT	GAAATGGAAG	CCTTGCTTCA
490	500	510	520	530	540
CGGTCCACCT	TTACTTAATA	ACACTGACGA	CCCTATGAGA	TTATGGAGTC	CGTATTATGC
550	560	570	580	590	600
AGACCAATTA	GTGCTATTG	CTAAACACTA	TGGTTTGTAT	GGCTGGTTGT	TCAATATTGA
610	620	630	640	650	660
ATGCGAATTC	TTTCCCTTTC	CTACAAATCC	AAAATTCAAA	GCTGAAGAGT	TGGCAAAGTT
670	680	690	700	710	720
TCTACACTAT	TTTAAGGAAA	AATTGCATTA	CGAAATACCT	GGATCTCAAC	TCATTTGGTA
730	740	750	760	770	780
GCGACGCAATG	ACAAATGAAG	GAGAAATCCA	CTGGCAGAAC	CAGCTCACAT	GCAAAATGA
790	800	810	820	830	840
GTATTTTTTT	AAAAACACGG	ATGGTATTTT	TTTGAATTAT	TGGTGGAAAA	AAGAATACCC
850	860	870	880	890	900
TGAAATGGCG	CGTAGAGTAG	CTGAAGGAAT	AGGTAGATCA	GGTTTAGAAG	TTTATTTTGG
910	920	930	940	950	960
TACAGATGTA	TGGGGAAGGC	ATACTTATGG	TGGCGGTGGT	TTCAAATCAT	ATAAGGGTGT
970	980	990	1000	1010	1020
AAAAACTGCC	TACTCTGCAA	TGACATCTTC	TGCATTATTT	GGTATGGCAT	GGACATACGA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GCATTTCGAA	AAGTCTGAAT	TTGAAAAGAT	GGATCGTTTG	TTTGGTGTGT	GTGGTAAATA
1090	1100	1110	1120	1130	1140
CTCTGACTAT	CCTCCCCAC	CTCCTAAAAA	CCCAGATGAC	GAAAAAGAAG	TAGAAAGCGA
1150	1160	1170	1180	1190	1200
TGATAGTGAA	GATGAGCTCA	TGTACGGACA	CAAGAAAGGT	ATTGCTGACA	CGGTAGAATC
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TATTCTGTGA	CCAGGAACAG	ATTGGTTTGT	TACCAATTTT	GATAGGGGGT	TTGGAAATAG
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GTTTATATAT	ACAGGAAGA	GATTACTTTC	TCAGCCTTGG	TCCATTATAT	CGCATCAAGC
1330	1340	1350	1360	1370	1380
TATTCCTCCC	AAATAAAGCT	ATCGAAATCC	AGAGATTTAT	CCCCTGATC	AAAACATTAA

図3 新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全長を含むpZL-EndoのSal I-Not I部位に挿入された断片の全塩基配列

【図 4】

1390	1400	1410	1420	1430	1440
AATCACTAGT	TCTCTOGATT	GCGATCATGG	AGCTTTTCTT	GGTGGAACTT	CGCTTATTAT
1450	1460	1470	1480	1490	1500
CAAAGGCCAA	CGTTTCAATC	ATAGAGAATC	GCATGATGTT	GAAACTGAAA	TTAGTATACC
1510	1520	1530	1540	1550	1560
TCTGTATAG	CTTTCATTAG	ATGCTAGTAA	AGGATGCTCA	TTGCGITATA	TTTATAGAAC
1570	1580	1590	1600	1610	1620
TTTGTGATG	AAAGATGTAA	AGTTGACAGT	AGCATGTCAC	TTTTCGTTAA	AAACAAACGA
1630	1640	1650	1660	1670	1680
CTCAGTTAAT	TTCTTCAAGG	TATGGCAGCC	AGATGAAAAT	TTCTCTTTTG	AATATGATGA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
TGGAATGAGA	GCCACTGTGA	CAACTGAAAA	TTCTACCGAA	AGCAGATGCT	TTTTATTACG
1750	1760	1770	1780	1790	1800
TACAACAGAA	GAAGATACAG	GAGAAAAATGA	TTGGATAACA	AAAACATTAT	ATGTGCCTGC
1810	1820	1830	1840	1850	1860
TGTTCCAGAA	GGAAGTCAAT	TATACATTAC	AAGACTTGAA	GTGAGCGTAG	TATTAGATAC
1870	1880	1890	1900	1910	1920
AGCTGGTTTA	GTAGGCTCTG	TTAATCAAGT	TATTGCTTGC	TTGGGATATA	TTAGCATCAT
1930	1940	1950	1960	1970	1980
ACCAACTATA	AATTCCTGAA	TAAAAACAGA	TTCATCACGC	ATTATTCAGG	ATCTCTTTTG
1990	2000	2010	2020	2030	2040
GAAAGATCAG	AAATATACCA	AAATCGGAAA	AGAAAGTTTA	GACGACATAG	CTCAAGAAGA
2050	2060	2070	2080	2090	2100
AGTTCAATAGA	TATTATGGAA	CATTGAACTG	GGAAAACACA	GCAAATGTAG	TAAACGCTTG
2110	2120	2130	2140	2150	2160
GGAGGAAATA	GATTACTACA	ACGTTTTTTA	CAAAGAAAGT	GACGACTCTG	CAACTCGCAT
2170	2180	2190	2200	2210	2220
CTTTTITAGGA	ACAGCATTCT	GTAATCAATT	TGTTGTATCT	GGTTTAGATA	TTATTTTATC
2230	2240	2250	2260	2270	2280
TAAGCTACCA	AAGATAGTTA	TTGAAGCTGT	TAACAAAGAA	GGATACATCT	CTTCAAGTGG
2290	2300	2310	2320	2330	2340
TAGCATAGAT	TTGTCAATTAA	ACTAGGACTT	GAAATAAAAT	ATTATGATAA	AGAAAAAATA
2350	2360	2370	2380	2390	2400
AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAG	GGCGGCGC

図 4 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全長を含む
pZL-EndoのSal I-Not I部位に挿入された断片の全塩基配列 (続き)

【図5】

5'	ATG	CCT	TCA	CTT	CAA	TTG	CAA	CCT	GAT	GAC	AAA	CTA	GCA	CCT	GTT	TCT	TTT	GCA	54
	M	P	S	L	Q	L	Q	P	D	D	K	L	A	P	V	S	F	A	
	CTT	AAG	TCT	ATG	AAT	GAG	TTG	AGG	GAC	TGG	ACG	CCA	GAC	GAA	AAG	ATA	AAG	TTT	108
	L	K	S	M	N	E	L	R	D	W	T	P	D	E	K	I	K	F	
	AAC	GTT	TCA	AGC	GTG	GCA	CTA	CAG	CCT	CGT	GTG	AAA	AAC	GCC	CTG	AAA	CCT	CAA	162
	N	V	S	S	V	A	L	Q	P	R	V	K	N	A	L	K	P	Q	
	TTA	TTG	TTA	ACT	CAT	GAT	ATG	GCA	GGA	GGA	TAT	AAA	GAA	GAT	AAA	AAT	ATT	CAA	216
	L	L	L	T	H	D	M	A	G	G	Y	K	E	D	K	N	I	Q	
	GGA	AAC	AAT	TAT	AAA	GAC	ATT	TAT	AAC	ATT	CAA	TAT	TGG	CAT	TTA	GCT	GAT	ACT	270
	G	N	N	Y	K	D	I	Y	N	I	Q	Y	W	H	L	A	D	T	
	TTT	GTA	TAT	TTC	TCT	CAT	GAG	CGA	GTT	AGC	ATT	CCT	CCA	GTC	AAT	TGG	ACA	AAT	324
	F	V	Y	F	S	H	E	R	V	S	I	P	P	V	N	W	T	N	
	OCT	TGT	CAT	AGA	AAT	GGT	GTA	AAG	TGT	TTA	GGT	ACT	TTT	TTA	GTA	GAA	GGA	AAT	378
	A	C	H	R	N	G	V	K	C	L	G	T	F	L	V	E	G	N	
	AAC	CAA	ATG	CAT	GAA	ATG	GAA	CCC	TTG	CTT	CAC	GGT	CCA	CCT	TTA	CTT	AAT	AAC	432
	N	Q	M	H	E	M	E	A	L	L	H	G	P	P	L	L	N	N	
	ACT	GAC	GAC	CCT	ATG	AGA	TTA	TGG	AGT	CCG	TAT	TAT	GCA	GAC	CAA	TTA	GTT	OCT	486
	T	D	D	P	M	R	L	W	S	P	Y	Y	A	D	Q	L	V	A	
	ATT	GCT	AAA	CAC	TAT	GGT	TTT	GAT	GGC	TGG	TTG	TTC	AAT	ATT	GAA	TGC	GAA	TTC	540
	I	A	K	H	Y	G	F	D	G	W	L	F	N	I	E	C	E	F	
	TTT	OCT	TTT	CCT	ACA	AAT	CCA	AAA	TTC	AAA	GCT	GAA	GAG	TTG	GCA	AAG	TTT	CTA	594
	F	P	F	P	T	N	P	K	F	K	A	E	E	L	A	K	F	L	
	CAC	TAT	TTT	AAG	GAA	AAA	TTG	CAT	AAC	GAA	ATA	CCT	GGA	TCT	CAA	CTC	ATT	TGG	648
	H	Y	F	K	E	K	L	H	N	E	I	P	G	S	Q	L	I	W	
	TAC	GAC	AGC	ATG	ACA	AAT	GAA	GGA	GAA	ATC	CAC	TGG	CAG	AAC	CAG	CTC	ACA	TGG	702
	Y	D	S	M	T	N	E	G	E	I	H	W	Q	N	Q	L	T	W	

図5 新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列、およびそれをコードするDNAの塩基配列

【図6】

711	720	729	738	747	756
AAA AAT CAG TTA TTT	TTT AAA AAC ACG GAT GGT ATT TTT TTG AAT TAT TGG TGG				
K N E L F F	K N T D G I F L N Y W W				
765	774	783	792	801	810
AAA AAA GAA TAC CCT	GAA ATG GCG CGT AGA GTA GCT GAA GGA ATA GGT AGA TCA				
K K E Y P E M A R R V A E G I G R S					
819	828	837	846	855	864
GGT TTA GAA GTT TAT TTT	GGT ACA GAT GTA TGG GCA AGG CAT ACT TAT GGT GGC				
G L E V Y F G T D V W G R H T Y G G					
873	882	891	900	909	918
GGT GGT TTC AAA TCA TAT	AAG GGT GTA AAA ACT GCC TAC TCT GCA ATG ACA TCT				
G G F K S Y K G V K T A Y S A M T S					
927	936	945	954	963	972
TCT GCA TTA TTT GGT ATG GCA TGG ACA TAC GAG CAT TTC	GAA AAG TCT GAA TTT				
S A L F G M A W T Y E H F E K S E F					
981	990	999	1008	1017	1026
GAA AAG ATG GAT CGT TTG TTT TGG TGT GGT GGT AAA TAC TCT	GAC TAT CCT CCC				
E K M D R L F W C G G K Y S D Y P P					
1035	1044	1053	1062	1071	1080
CCA CCT CCT AAA AAC CCA GAT GAC GAA AAA GAA GTA GAA AGC GAT GAT AGT GAA					
P P P K N P D D E K E V E S D D S E					
1089	1098	1107	1116	1125	1134
GAT GAG CTC ATG TAC GGA CAC AAG AAA GGT ATT GCT GAC ACG GTA GAA TCT ATT					
D E L M Y G H K K G I A D T V E S I					
1143	1152	1161	1170	1179	1188
CCT GTA CCA GGA ACA GAT TGG TTT GTT ACC AAT TTT GAT AGG GGG TTT GGA AAT					
P V P G T D W F V T N F D R G F G N					
1197	1206	1215	1224	1233	1242
AGG TTT TAT TAT AGA GGA AAG AGA TTA CTT TCT CAG CCT TGG TCC CAT TTA TGG					
R F Y Y R G K R L L S Q P W S H L S					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
CAT CAA GCT ATT CTC CCC AAT AAA AGC TAT CGA AAT CCA GAG ATT TAT CCC ACT					
H Q A I L P N K S Y R N P E I Y P T					
1305	1314	1323	1332	1341	1350
GAT CAA AAC ATT AAA ATC ACT AGT TCT CTC GAT TGC GAT CAT GGA GCT TTT CTT					
D Q N I K I T S S L D C D H G A F L					
1359	1368	1377	1386	1395	1404
GGT GGA ACC TGG CTT ATT ATC AAA GGC CAA CGT TTC AAT CAT AGA GAA TGG CAT					
G G T S L I I K G Q R F N H R E S H					
1413	1422	1431	1440	1449	1458
GAT GTT GAA ACT GAA ATT AGT ATA CCT CTC TAT AAG CTT TCA TTA GAT GCT AGT					
D V E T E I S I P L Y K L S L D A S					

図6 新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列、およびそれをコードするDNAの塩基配列 (続き)

【図7】

1467	1476	1485	1494	1503	1512
AAA GGA TGC TCA TTG CGT TAT ATT TAT AGA ACT TTG TTG ATG AAA GAT GTA AAG					
K G C S L R Y I Y R T L L M K D V K					
1521	1530	1539	1548	1557	1566
TTG ACA GGA GCA TGT CAC TTT TCG TTA AAA ACA AAC GAC TCA GTT AAT TTC TTC					
L T V A C H Y S L K T N D S V N F F					
1575	1584	1593	1602	1611	1620
AAG GTA TGG CAG CCA GAT GAA AAT TTC TCT TTT GAA TAT GAT GAT CCA ATG AGA					
K V W Q P D E N F S F E Y D D G H R					
1629	1638	1647	1656	1665	1674
GCC ACT GTT ACA ACT GAA AAT TCT ACC GAA AGC AGA TGC TTT TTA TTA CGT ACA					
A T V T T E N S T E S R C F L L R T					
1683	1692	1701	1710	1719	1728
ACA GAA GGA GAT ACA GGA GAA AAT GAT TGG ATA ACA AAA ACT ATT AAT GTG CCT					
T E E D T G E N D W I T K T I N V P					
1737	1746	1755	1764	1773	1782
GCT GTT CCA GAA GGA AGT CAA TTA TAC ATT ACA AGA CIT GAA GTG AGC GTA GTA					
A V P E G S Q L Y I T R L E V S V V					
1791	1800	1809	1818	1827	1836
TTA GAT ACA GCT GGT TTA GTA GGT CTT GTT AAT CAA GTT ATT GCT TGC TTG GGA					
L D T A G L V G L V N Q V I A C L G					
1845	1854	1863	1872	1881	1890
TAT ATT AGC ATC ATA CCA ACT ATA AAT TCT GGA ATA AAA ACA GAT TCA TCA CGC					
Y I S I I P T I N S G I K T D S S R					
1899	1908	1917	1926	1935	1944
ATT ATT CAG GAT CTC TTT TGG AAA GAT CAG AAA TAT ACC AAA ATC GGA AAA GAA					
I I Q D L F W K D Q K Y T K I G K E					
1953	1962	1971	1980	1989	1998
AGT TTA GAC GAC ATA GCT CAA GAA GAA GTT CAT AGA TAT TAT GGA ACA TTG AAC					
S L D D I A Q E E V H R Y Y G T L N					
2007	2016	2025	2034	2043	2052
TGG GAA AAC ACA GCA AAT GTA GTA AAC GCT TGG GAG GAA ATA GAT TAC TAC AAC					
W E N T A N V V N A W E E I D Y Y N					
2061	2070	2079	2088	2097	2106
GTT TTT TAC AAA GAA AGT GAC GAC TCT GCA ACT CGC ATC TTT TTA GGA ACA GCA					
V F Y K E S D D S A T R I P L G T A					
2115	2124	2133	2142	2151	2160
TTC TGT AAT CAA TTT CGT GTA TCT GGT TTA GAT ATT ATT TTA TCT AAG CTA CCA					
F C N Q F R V S G L D I I L S K L P					
2169	2178	2187	2196	2205	2214
AAG ATA GTT ATT GAA GCT GTT AAC AAA GAA GGA TAC ATC TCT TCA AGT GGT AGC					
K I V I E A V N K E G Y I S S S G S					
2223	2232				
ATA GAT TTG TCA TTA AAC TAG 3'					
I D L S L N *					

図7 新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列、およびそれをコードするDNAの塩基配列 (続き)

【図 8】

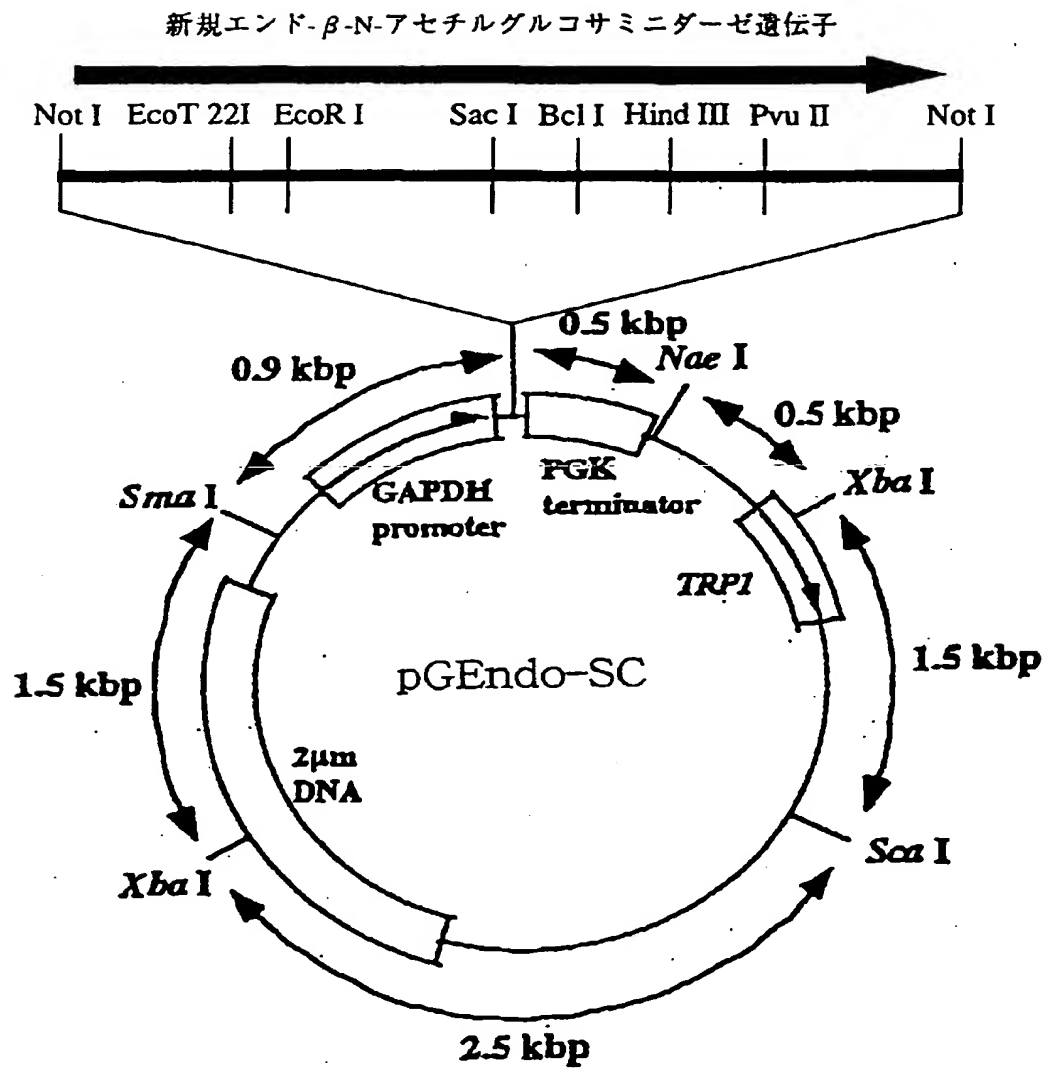


図 8 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子を含む
サッカロミセス セレビシエ用の発現ベクター pGEndo-SC の構造

【図 9】

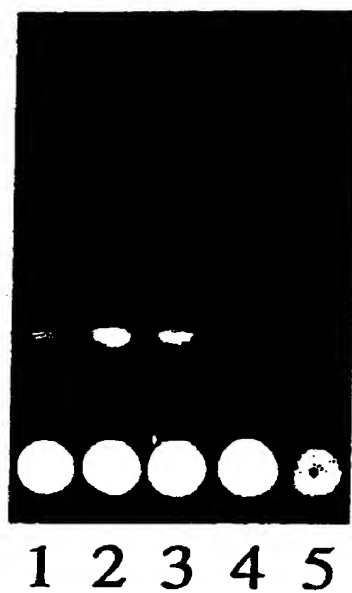


図 9 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子が
導入された酵母での該酵素の発現

レーン 1～3 : エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子を導入した
S. cerevisiae YPH500 (pep4)細胞抽出液

レーン 4 : *M. hiemalis*由来精製エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ

レーン 5 : *S. cerevisiae* YPH500 (pep4)細胞抽出液

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の提供。

【解決手段】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子。

(a) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号3に示されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000253503

【住所又は居所】 東京都中央区新川二丁目10番1号

【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100091096

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】 石井 貞次

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000253503]

1. 変更年月日	1995年 6月14日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区新川二丁目10番1号
氏 名	麒麟麦酒株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)